

# 固相萃取/高效液相色谱 - 串联质谱法测定 水中百草枯与敌草快残留

赵 静, 李 琛, 郭自国, 余 静, 王 伟, 曾 军, 高 进\*

(湖北省农产品质量安全检测中心, 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 建立了水中百草枯和敌草快的固相萃取/高效液相色谱 - 串联质谱测定方法。样品直接经 Cleanert PWCX 小柱富集净化, HILIC 亲水型液相色谱柱分离, 5 mmol/L 乙酸铵用(用甲酸调至 pH 3.7) - 乙腈梯度洗脱, 采用电喷雾离子源正离子模式采集, 选择性反应监测模式下检测, 外标法定量。结果表明, 百草枯和敌草快分别在 10.0 ~ 200.0  $\mu\text{g/L}$  和 1.0 ~ 200.0  $\mu\text{g/L}$  质量浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系数( $r^2$ ) 均不小于 0.997, 在 30 ~ 200  $\mu\text{g/L}$  的加标水平下, 百草枯和敌草快的平均回收率分别为 96.8% ~ 125.8% 和 97.2% ~ 118.2%, 批内相对标准偏差(RSD) 分别为 3.0% ~ 6.3% 和 2.9% ~ 6.0%; 批间 RSD 分别为 3.3% ~ 8.2% 和 2.7% ~ 7.9%。以 3 倍信噪比计算, 百草枯和敌草快的方法检出限分别为 5.0  $\mu\text{g/L}$  和 0.3  $\mu\text{g/L}$ ; 以 10 倍信噪比计算, 方法的定量下限分别为 10.0  $\mu\text{g/L}$  和 1.0  $\mu\text{g/L}$ 。该方法简便、快速、灵敏, 方法的线性范围、回收率、精密度和检出限均符合残留分析的要求, 能满足水中百草枯、敌草快残留监控的要求。

**关键词:** 水; 百草枯; 敌草快; 固相萃取(SPE); 高效液相色谱 - 串联质谱(HPLC - MS/MS); 除草剂残留

**中图分类号:** O657.63; F767.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2018)05 - 0626 - 05

## Determination of Paraquat and Diquat Residues in Water by High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry with Solid Phase Extraction

ZHAO Jing, LI Chen, GUO Zi-guo, YU Jing, WANG Wei, ZENG Jun, GAO Jin\*

(Hubei Inspection Center for Quality and Safety of Agricultural Products, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** A method was developed for the determination of paraquat and diquat residues in water by high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry with solid phase extraction. The samples were cleaned up by Cleanert PWCX solid phase extraction, separated on a HILIC column using acetonitrile - 5 mmol/L ammonium acetate (pH 3.7 with formic acid) as mobile phase by gradient elution, then detected in SRM mode and quantified by external standard method with the matrix-matched calibrations. The calibration curves for paraquat and diquat showed good linearities in the concentration ranges of 10.0 - 200.0  $\mu\text{g/L}$  and 1.0 - 200.0  $\mu\text{g/L}$ , respectively, with correlation coefficients( $r^2$ ) no less than 0.997. The average recoveries for paraquat and diquat in agricultural environmental water at spiked levels of 30 - 200  $\mu\text{g/L}$  were in the ranges of 96.8% - 125.8% and 97.2% - 118.2%, with intra-assay relative standard deviations (RSDs) of 3.0% - 6.3% and 2.9% - 6.0%, and inter-assay relative standard deviations of 3.3% - 8.2% and 2.7% - 7.9%, respectively. The limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs) of the method were 5.0  $\mu\text{g/L}$  and 0.3  $\mu\text{g/L}$ , and 10.0  $\mu\text{g/L}$  and 1.0  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The results indicated that the developed method is easy, fast and sensitive, its indicators such as the linear range, recovery, precision and detection limit could meet the requirements for residue analysis. The method is suitable for the determination of paraquat and diquat in agricultural environmental water

收稿日期: 2017 - 12 - 07; 修回日期: 2018 - 01 - 27

基金项目: 湖北省农产品质检中心创新项目

\* 通讯作者: 高 进, 高级畜牧师, 研究方向: 农产品质量安全及农业环境中主要除草剂残留检测, Tel: 027 - 87286579, E-mail: 756878993@QQ.com

**Key words:** water; paraquat; diquat; solid phase extraction( SPE); high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry( HPLC – MS/MS); pesticide residues

百草枯(1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶二氯化物)和敌草快(1,1'-亚乙基-2,2'-联吡啶二溴化物)均为联吡啶类季铵盐,属于高效、廉价的非选择性触杀灭生型除草剂,可有效杀死一年或多年生杂草,且无耐药性。它们曾长期被认为是对环境无害类农药,其产量和用量在世界上名列前茅,被全球推广使用。近年来,此类除草剂已被世界卫生组织分类为中等毒性农药,特别是百草枯的毒性极大,会造成心肺和肝肾等严重毒害,一旦中毒,无有效解毒药物,口服中毒死亡率达90%以上。我国是百草枯生产使用大国,也是中毒者数量最多的国家。随着社会经济的发展,作物生长环境的风险隐患逐渐成为焦点。目前我国现行标准有SN/T 0293-2014<sup>[1]</sup>和DB22/T 1627-2012<sup>[2]</sup>等,GB/T 2763-2016在部分蔬菜、水果、谷物、油料中分别对百草枯和敌草快作出了限量要求<sup>[3]</sup>;国外标准中,美国环保署(EPA)规定饮用水中敌草快、百草枯的最大残留限量值分别为20、3 μg/L。百草枯和敌草快易溶于水,不易溶于有机溶剂,在酸性和中性溶液中稳定,具有强离子特性,目前的检测方法有电化学法、光谱法、色谱法和质谱法<sup>[4-6]</sup>,其中液相色谱-质谱法是发展趋势所在,但常规液质分析时,多采用反向柱,不仅要用离子对试剂,还会造成色谱峰严重拖尾,同时抑制离子化效率,检测难度很高。但如果选用亲水性色谱柱,不仅能简化操作,还可增强离子化效率,提高灵敏度。目前,亲水柱的选择很多,多数需配合高浓度缓冲盐作为流动相,但高盐易造成系统堵塞。本方法选用常规低浓度盐作为流动相,通过调节pH值,提高了百草枯和敌草快的分离洗脱效果。文献报道中多采用液液萃取、在线固相萃取和分离固相萃取法<sup>[7-9]</sup>进行提取,但液液萃取易乳化,在线固相萃取设备并不普及,而分离固相萃取具有操作简单、快速、萃取回收率高的优点,可以选择适合碱性化合物提取的小柱富集净化样品,如WCX、OASIS WCX等小柱或功能相似者,进而获得较好的分离效果。

本文以农业生产用水(养殖、灌溉用水)为对象,采用Cleanert PWCX固相萃取柱富集净化样品,结合高效液相色谱-串联质谱技术,通过优化固相萃取吸附洗脱条件及仪器条件等,建立了固相萃取/高效液相色谱-串联质谱测定水中百草枯和敌草快的分析方法,并利用该方法研究了农业生产用水样品中此2种除草剂的残留情况。本方法快速、准确、方便、灵敏度高,为监控水体质量、了解其污染水平和风险隐患提供了技术支撑。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Thermo Fisher Science Surveyor Plus液相色谱系统(美国Thermo公司),TSQ Quantum Ultra EMR三重四极杆串联质谱仪(美国Thermo公司);分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);水浴氮吹仪(OA SYS,美国Organomation公司);微型涡旋振荡器(WH-3,上海楚定分析仪器有限公司);Cleanert PWCX(60 mg/3 mL,艾杰尔公司)。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,美国J. T. Baker公司);其他试剂均为分析纯;实验用水由制水仪系统制得(Milli-Q,美国Millipore公司);标样:百草枯二氯化物(纯度>98%,美国O2si公司);敌草快二溴化物(纯度>99%,德国Dr. E公司)。

### 1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Thermo Synchronis HILIC(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm i. d.); 流动相: A为5 mmol/L乙酸铵水溶液(用甲酸调至pH 3.7), B为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 20% A, 1.0~1.1 min, 20%~85% A; 1.1~2.0 min, 85% A; 2.0~3.5 min, 85%~20% A; 3.5~5.0 min, 20% A; 柱温: 35 °C; 进样量: 2 μL; 流速: 300 μL/min; 运行时间: 5 min。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI); 正离子模式采集; 扫描模式: SRM; 干燥气: 氮气; 鞘气: 10.5 L/min; 辅助气: 3 L/min; 离子传输管温度: 300 °C; 喷雾电压: 3 000 V, 碰撞气: 氩气, 1.0 mTorr, 质谱参数见表1。

表 1 百草枯和敌草快的质谱条件  
Table 1 MS/MS conditions for the detection of paraquat and diquat

Analyte	Precursorion( $m/z$ )	ESI	Product ion( $m/z$ )	CE( V )	Retention time( min )
Paraquat( 百草枯 )	186	+	171* , 155	13 , 22	3.35
Diquat( 敌草快 )	183	+	157* , 130 , 78	18 , 23 , 25	3.33

\* quantitation ion

### 1.3 样品前处理

1.3.1 试样保存 将采集的农业生产用水样品存于洁净的聚四氟乙烯瓶内，密封避光 4 °C 保存，若水体浑浊可在测定前用定性滤纸进行初级过滤，以防止堵塞固相萃取柱，并尽快完成测定。

1.3.2 净化 分别用 1.0 mL 甲醇和水活化 Cleanert PWCX 小柱，弃去流出液，然后移取 10 mL 样品上清液过柱。用 5% ( 体积分数 ) 甲醇溶液淋洗萃取柱，以 2 mL 10% ( 体积分数 ) 甲酸 - 乙腈溶液洗脱，整个过程速度保持约 1 mL/min，收集洗脱液于塑料离心管中。于 45 °C 的水浴氮气吹至近干，用 1.0 mL 乙腈 - 0.1% 甲酸水溶液 ( 50 : 50，体积比，下同 ) 振荡溶解残渣，过 0.22 μm 滤膜，待测。

### 1.4 标准溶液配制

称取适量标准物质用乙腈 - 0.1% 甲酸水溶液 ( 50 : 50 ) 稀释，分别配制成 100 mg/L 的标准储备液，4 °C 避光保存。移取适量标准储备液再用乙腈 - 0.1% 甲酸水溶液 ( 50 : 50 ) 分别逐级稀释，配制成百草枯为 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 μg/L，敌草快为 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μg/L 的系列质量浓度标准溶液，在 “1.2” 实验条件下测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的优化

百草枯和敌草快是联吡啶类季铵盐，具有强离子特性，若通过反向色谱柱必须使用离子对试剂，但离子对试剂会抑制离子化效率，影响其检测灵敏度，为避免使用离子对试剂，采用亲水性色谱柱 Synchronis HILIC 进行分离。优化质谱条件时，采用针泵注入质量浓度均为 1 000 μg/L 的混合标准溶液，流速设为 300 μL/min，等比例注入流动相 A 和 B，利用该标准溶液在全扫描模式下优化喷雾电压、干燥气流量和离子传输管温度等参数，得到待测物最强的分子离子峰，在选择性反应监测模式下利用仪器自动优化碎片离子寻找最佳碰撞能和透镜电压：其中，敌草快选择  $m/z$  183 > 157、183 > 130、183 > 78，与文献报道<sup>[1]</sup>相符；百草枯由于裂解，会出现  $m/z$  186 > 171、186 > 155、185 > 170、171 > 155、93 > 171 多个分子离子，但在样品分析时， $m/z$  186 作为分子离子时的信号值更稳定，可以获得更好的灵敏度，在低浓度样品测定时的干扰小，因此百草枯选用  $m/z$  186 > 171 和  $m/z$  186 > 155 作为离子对。

### 2.2 色谱条件的优化

由于百草枯和敌草快的强极性和正电荷，极易在色谱柱上吸附而不易洗脱，所以用乙酸铵缓冲液作为流动相洗脱阳离子化合物，通常可使用浓度为 100 ~ 150 mmol/L 的缓冲盐，以加快出峰并增强响应值，但盐浓度过高易对管路系统特别是进样针和喷针造成堵塞，而季铵盐为碱性化合物，在酸性条件下可以优化峰形减少拖尾，同时提高仪器的响应值，故选择 5 mmol/L 的乙酸铵溶液并用甲酸调节 pH 值为 3.7，再结合乙腈作为梯度洗脱溶液，达到了洗脱分离的效果。另外为减少柱残留应降低进样量，本研究的进样量为 2 μL，在进样后再用 2.5 mL 乙腈冲洗进样针的内外壁。

### 2.3 净化条件的优化

百草枯和敌草快呈碱性，易溶于水，在中性和酸性条件下稳定，因此选用 Cleanert PWCX 小柱富集净化，采用实际水产养殖水样加标，在相同的上样量下，分别用 5%、10%、15% 甲酸 - 乙腈作为洗脱溶液，通过回收率考察前处理效率。实验发现，10% 甲酸 - 乙腈洗脱的回收率明显优于 5%，而用 10% 和 15% 甲酸 - 乙腈洗脱时回收率相差不多，因此最终采用 10% 甲酸 - 乙腈作为洗脱溶液。

另外以 10% 甲酸 - 乙腈为洗脱溶液，考察了洗脱体积分别为 1、2、3 mL 时的回收率，发现样品基质加标样为低浓度时，洗脱体积的变化对结果影响不大，但样品基质加标样为高浓度时，2、3 mL 的洗脱效果明显优于 1 mL，因此实验选用 2 mL 作为洗脱体积。

## 2.4 线性范围、检出限与定量下限

用乙腈-0.1%甲酸水溶液(50:50)配制质量浓度为10.0~200.0 μg/L百草枯及质量浓度为1.0~200.0 μg/L敌草快的混合标准溶液,以各组分的定量离子对峰面积( $y$ )对其质量浓度( $x$ , μg/L)绘制标准曲线。结果显示,百草枯和敌草快在相应的质量浓度范围内具有良好的线性关系,其线性方程分别为 $y = -1\ 610.34 + 88.831\ 3x$ ,  $r^2 = 0.997$ ;  $y = -2\ 850.98 + 3\ 900.83x$ ,  $r^2 = 0.998$ 。

分别以3倍信噪比( $S/N \geq 3$ )及 $S/N \geq 10$ 计算检出限(LOD)和定量下限(LOQ),得到方法中百草枯和敌草快的LOD分别为5.0、0.3 μg/L, LOQ分别为10.0、1.0 μg/L。

## 2.5 回收率与相对标准偏差

以水产养殖水为例,任意选取1个阴性样品进行加标回收率试验,分别制成30、100、200 μg/L 3个水平的加标样品,按照实验方法进行处理和测定,每批次内同一浓度做6次平行实验,加标回收率如表2所示,加标提取离子流谱图如图1所示。结果显示,百草枯的平均回收率为96.8%~125.8%,敌草快的平均回收率为97.2%~118.2%,批内相对标准偏差(RSD)分别为3.0%~6.3%和2.9%~6.0%,批间RSD分别为3.3%~8.2%和2.7%~7.9%。实际检测中,上样量为10 mL时,本研究中百草枯和敌草快的定量下限分别为1.0 μg/L和0.1 μg/L,方法的灵敏度满足国际最大残留限量的要求。

表2 百草枯和敌草快的回收率、精密度、检出限及定量下限( $n=6$ )

Table 2 Recoveries, intra- and inter-precisions, limits of detection(LODs) and limits of quantitation(LOQs) of paraquat and diquat( $n=6$ )

Compound	Added(μg/L)	Recovery/%	Intra-RSD/%	Inter-RSD/%	LOD(μg/L)	LOQ(μg/L)
Paraquat	30, 100, 200	125.8, 96.8, 100.8	6.3, 3.5, 3.0	8.2, 3.8, 3.3	5.0	10.0
Diquat	30, 100, 200	118.2, 97.2, 103.1	6.0, 5.4, 2.9	7.9, 6.0, 2.7	0.3	1.0

## 2.6 方法应用

为验证方法的可靠性和实用性,采用优化的前处理方法和分析条件对湖北省主要农业生产区抽取的养殖水和灌溉水等类别共26份样本进行分析。检测结果表明,有1份水样检出百草枯(质量浓度为0.53 μg/L),3份水样检出敌草快(质量浓度分别为0.16、0.06、0.07 μg/L),其中敌草快达到定量下限的1份,占3.7%,其他水样均未检出两种除草剂。

## 3 结论

本研究建立了农业生产用水中常用除草剂百草枯和敌草快残留的固相萃取/高效液相色谱-串联质谱测定方法。该方法具有样品处理简单,线性范围宽,重现性好,快速准确等特点。与已有方法相比,本方法采用Cleanert PWCX小柱直接富集净化,酸化乙腈洗脱,其成本低,效果稳定。实验用亲水柱HILIC分离,避免了离子对试剂抑制离子化效率,提高了灵敏度,再用酸化低浓度铵盐缓冲液结合乙腈作流动相可以很好地分离洗脱百草枯和敌草快,有效减少了柱保留,提高了检测的准确性,对监控水体质量,了解其污染水平和风险隐患具有重要意义。

### 参考文献:

- [1] SN/T 0293-2014. Determination of Paraquat and Diquat Residues in Foodstuffs of Plant Origin for Export - LC-MS/MS Method. The Entry-Exit Inspection and Quarantine of the People's Republic of China Industry Standard(出口植物源性食品中百草枯和敌草快残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准).
- [2] DB22/T1627-2012. Determination of Paraquat Residues in Maize for LC-MS/MS Method. Local Standard of Jilin Province(玉米中百草枯残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法. 吉林省地方标准).

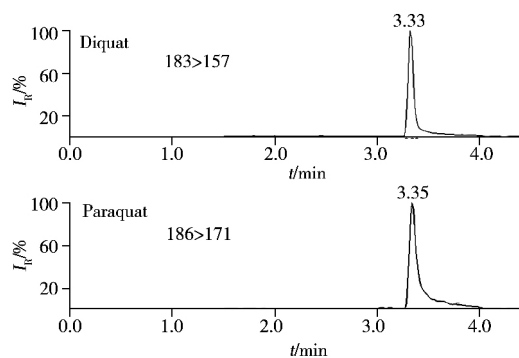


图1 空白样品加标200 μg/L敌草快和百草枯的选择反应监测(SRM)色谱图

Fig. 1 Select reaction monitoring chromatograms (SRM) of diquat and paraquat in spiked blank sample(200 μg/L)

感, 其他金属离子对该材料的荧光强度影响不明显。将该材料用于食品中  $\text{Hg}^{2+}$  的检测, 结果表明, Zn-MOF 材料可以便捷、有效地检测出食品中的  $\text{Hg}^{2+}$ 。该 Zn-MOF 材料荧光探针可为食品中  $\text{Hg}^{2+}$  的定量研究提供参考。

参考文献:

- [1] Cai S, Lao K, Lau C, Lu J. *Anal. Chem.*, **2011**, 83(24): 9702-9708.
- [2] Wu X L, Lai J P, Zhao Y B. *Chem. J. Chin. Univ.* (吴小丽, 赖金平, 赵一兵. 高等学校化学学报), **2012**, 33(4): 695-699.
- [3] Ren X L, Zhang J, Shao X T. *Metall. Anal.* (任秀丽, 张静, 邵新田. 冶金分析), **2015**, 35(4): 30-33.
- [4] Madrakian T, Zадpour B, Ahmadi M, Afkhami A. *J. Iranian Chem. Soc.*, **2015**, 12(7): 1235-1243.
- [5] Childress E S, Roberts C A, Sherwood D Y, Leguyader C L, Harbron E J. *Anal. Chem.*, **2012**, 84(3): 1235-1239.
- [6] Li J, Fu H R, Zhang J, Zheng L S, Tao J. *Inorg. Chem.*, **2015**, 54(7): 3093-3095.
- [7] Xu C H, Zhuang H T, Zhong Y J, Zhu W D. *J. Zhejiang Norm. Univ.* (许春慧, 庄海棠, 钟依均, 朱伟东. 浙江师范大学学报), **2011**, 34(4): 429-435.
- [8] Ma D Y, Wang W X, Li Y W, Li J, Daigebone C, Clavez G, Guillou O. *Crystengcomm*, **2010**, 12(12): 4372-4377.
- [9] Chen L, Duan B, Luo Q, Gu Z, Liu J, Duan C Y. *Catal. Sci. Technol.*, **2016**, 6(6): 1616-1620.
- [10] Liu L, Han Z B, Wang S M, Yuan D Q, Ng S W. *Inorg. Chem.*, **2015**, 54(8): 3719-3721.
- [11] Tan L L, Song N, Zhang X A, Li H W, Wang B, Yang Y W. *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 4(1): 135-140.
- [12] Bag P P, Wang D, Chen Z, Cao R. *Chem. Commun.*, **2016**, 52(18): 3669-3672.
- [13] Ma D Y, Xie J, Zhu Z, Huang H, Chen Y, Su R, Zhu H. *Inorg. Chem. Commun.*, **2017**, 86: 128-132.
- [14] Jin H G, Yan Y Z, Li J, Gu Z G, Chen J H, Liu Y T, Zheng Z P, Zhan Q G, Cai Y P. *Inorg. Chem. Commun.*, **2012**, 23(27): 25-30.
- [15] Ma D, Li Y, Li Z. *Chem. Commun.*, **2011**, 47(26): 7377-7379.
- [16] Wu Y, Henke S, Kieslich G, Schwedler I, Yang M, Fraser D A X, Hare D O. *Angew. Chem.*, **2016**, 55(45): 14081-14084.
- [17] Yuan Y J, Yu Z T, Li Y H, Lu H W, Chen X, Tu W G, Ji Z G, Zou Z G. *Appl. Catal. B*, **2016**, 181: 16-23.
- [18] Loiseau T, Ferey G, Volkringer C, Taulelle F, Haouas M. U. S. Patent, US8907114. **2014**.
- [19] Wu H, Gong Q, Olson D H, Li J. *Chem. Rev.*, **2012**, 112(2): 836-868.

(上接第 629 页)

- [3] GB/T2763-2016. National Food Safety Standard - Maximum Residue Limits for Pesticides in Food. Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准. 食品中农药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准).
- [4] Song T, He X Y, Fan X M, Wei Y, Hua J. *J. Instrum. Anal.* (宋桃, 何晓英, 范向明, 魏胤, 华俊. 分析测试学报), **2011**, 30(1): 48-52.
- [5] Li J, Yang F, Lu S Y, Liu Z C, Wang Y, Lan J C, Jiang J B, Chen Y G. *Chin. J. Anal. Lab.* (李捷, 杨方, 卢声宇, 刘正才, 王彦, 蓝锦昌, 江锦彬, 陈言贵. 分析实验室), **2014**, 59(33): 537-541.
- [6] Whitehead J R D, Montesano M A, Jayatilaka N K, Buckley B, Winnik B, Needham L L, Barr D B. *J. Chromatogr. B*, **2010**, 878: 2548-2553.
- [7] Lee X P, Kumazawa T, Fujishiro M, Hasegawa C, Arinobu T, Sino H, Ishii A, Sato K. *J. Mass Spectrom.*, **2004**, 39: 1147-1152.
- [8] Li H M, Sun S W, Shi X F. *Chin. J. Anal. Chem.* (李红梅, 孙守威, 史谢飞. 分析化学), **2007**, 10(35): 1499-1502.
- [9] Chen J, Liu Z J, An B C, Lu Y, Xu Q. *Chin. J. Chromatogr.* (陈静, 刘召金, 安保超, 卢燕, 许群. 色谱), **2012**, 30(10): 1068-1073.